

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3452068号
(P3452068)

(45) 発行日 平成15年9月29日 (2003.9.29)

(24) 登録日 平成15年7月18日 (2003.7.18)

(51) Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/531
33/536

識別記号

F I
G 0 1 N 33/531
33/536

B
D

請求項の数 3 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平9-541578	(73) 特許権者	999999999 バイエル・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国デー51368レーフェル クーゼン
(86) (22) 出願日	平成9年5月23日 (1997.5.23)	(72) 発明者	クラーン, トマス ドイツ連邦共和国デー58135ハーゲ ン・ビーナーシュトラッセ29
(65) 公表番号	特表2000-512746 (P2000-512746A)	(72) 発明者	バフハフゼン, ボルフガング ドイツ連邦共和国デー51381レーフェル クーゼン・デュルシャイダーベーク17
(43) 公表日	平成12年9月26日 (2000.9.26)	(72) 発明者	シヤデ, アンドレアス ドイツ連邦共和国デー45277エツセン・ クリュムゲンスフェルト1ペー
(86) 国際出願番号	P C T / E P 9 7 / 0 2 6 6 2	(74) 代理人	999999999 弁理士 小田島 平吉 (外1名)
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 0 4 5 7 3 9	審査官	宮澤 浩
(87) 国際公開日	平成9年12月4日 (1997.12.4)		
審査請求日	平成13年3月22日 (2001.3.22)		
(31) 優先権主張番号	1 9 6 2 1 3 1 2 . 6		
(32) 優先日	平成8年5月28日 (1996.5.28)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (D E)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物医学的アッセイの光学的分析における背景の蛍光及びルミネッセンスのマスキング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 相互に接触した細胞の層の形態で反応容器

(1) の底 (2) における透明支持体に適用され且つ蛍光色素 (4) を含有する溶液 (3) と接触している蛍光標識された生物細胞 (5) ; あるいは透明支持体上に置かれた相互に接触した細胞の層の形態のルミネセント生物細胞の定量的光学的分析方法であって、

(A) すでに存在する蛍光色素 (4) の他に、蛍光色素 (4) のための励起光 (6) 及び／又はその発出光 (7) を吸収する細胞膜非透過性のマスキング色素 (9) を溶液 (3) に添加し、及び／又は

(B) 溶液透過性であり且つ蛍光色素 (4) のための励起光 (6) 及び／又はその発出光 (7) を吸収及び／又は反射するかあるいはルミネセント細胞層の場合には

ルミネセント光を反射する分離層 (10) を細胞層に適用することを特徴とする方法。

【請求項2】 蛍光リガンド又はルミネセントリガンド (13) が溶解されている溶液 (3) で満たされた反応容器 (1) 中で蛍光標識もしくはルミネセント標識された反応成分を定量的光学的に分析するための、溶液 (3) がレセプター層 (12) と接触しており、レセプター層 (12) がリガンド (13) に特異的であり且つ反応容器 (1) の底 (2) における透明支持体に適用されているか又はその上に堆積されており、そしてレセプターリガンド結合に特徴的なレセプター層 (12) からの蛍光放射もしくはルミネセント放射 (7、15) を透明な底 (2) を介して検出し分析する方法であって、マスキング色素 (9) を溶液 (3) に添加し及び／又は

溶液(3)透過性の分離層(10)をレセプター層(12)に適用し、その際、マスキング色素(9)及び/又は分離層(10)の光学的性質を、溶液(3)中に存在するリガンド(13)の蛍光色素(4)のための励起光(6)及び/又はその蛍光(8)もしくはそのルミネセント光が溶液(3)又は分離層(10)により吸収されるかあるいは分離層(10)において反射されるように選ぶことを特徴とする方法。

【請求項3】用いられる分離層(10)がポリマーラテックスビーズの層であることを特徴とする請求の範囲第1又は2項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は蛍光色素溶液と接触している蛍光標識された生物細胞あるいは反応容器の底における透明支持体にコヒーレント細胞層(coherent cell layer)の形態で適用されるルミネセント細胞あるいは別の場合、蛍光もしくはルミネセントリガンドが溶解されており、このリガンドに特異的で反応容器の底における透明支持体上に置かれていてレセプターーリガンド結合に特徴的なその蛍光もしくはルミネセント放射が透明な底を介して検出され、分析されるレセプター層と接触している溶液中の蛍光もしくはルミネセント標識された反応成分の定量的光学的分析のための方法に由来する。

生物医学的アッセイの蛍光測定における問題は多くの場合、生物細胞の作用と関連する蛍光の変化が非特異的な背景の蛍光と比較して小さいことである。結果として分解能が非常に制限される。通常の市販の測定システム(蛍光読み取り機、Dynatech又はSLT)は、その光学的測定配置(上澄み液の蛍光液柱を介する「上」からの励起)のために、背景と比較してシグナルをほとんど検出できないので、その問題を解決することができない。細胞を反応容器の透明支持体を介して後から照射するもっと新しい構成の装置(Labsystems)は、励起光が入ると細胞が励起されて蛍光を発するという利点を有する。しかし励起光はさらに上澄み液の中に入り、それも蛍光性であるので、非特異的背景シグナルが細胞のシグナルを不純にするという事実を避けることはできない。非常に複雑な測定システム(NovelTech, FLIPR: Fluorescence Imaging Plate Reader)でさえ、特別なレーザー照射幾何学(約45°より下の励起(excitation below about 45°))を用いて始めてこの背景の蛍光を減少させることができる。問題を解決する測定の幾何学についてのすべての実験の失敗の理由は、背景の蛍光の実際の原因がこれによって決定的に影響を受け得ないことである。

蛍光もしくはルミネセント標識されたリガンドを用いて今日まで行われているレセプター結合研究の場合、それぞれの場合の標識非結合画分は洗浄などの方法により除去されねばならない。しかし多くのコーティングはこれらの洗浄段階に敏感である。さらに非結合リガンドの

除去にはかなりの費用が伴う。この方法ではレセプターーリガンド会合又は解離の直接の測定は不可能である。

本発明は細胞アッセイにおける蛍光標識された細胞又はルミネセント細胞の光学的分析の感度を向上させ、例えば電位一感受性色素の蛍光変化に基づいて可能な限り低い膜電位変化を測定できるようにする目的に基づいている。この場合測定システムの感度は、5mV未満の電位変化を少なくとも定性的に検出できる程高くてはならない。ルミネセント細胞の場合、ルミネセンスシグナルの検出における増加が達成されねばならない。さらに該方法は高い試料処理量のスクリーニングに適していないなければならない。

本発明はさらに、蛍光もしくはルミネセント標識されたリガンドもしくはレセプターに基づくレセプター結合研究を簡単にし、レセプター結合相互作用の継続的測定(速度論)を可能にする目的に基づいている。必要なプロセス段階の減少のおかげで、この方法は高い処理量のスクリーニング及び診断用途に特に適しているはずである。

低い膜電位変化で必要な高い分解能を達成することは、非特異的な背景蛍光と細胞の特異的な蛍光の抵触する重なりの原因を取り除くことができ始めて可能であった。この目的のために開発される本発明の方法は、励起エネルギー及び生物学的対象に由来しない蛍光をマスキングするという基本的に新規なアイデアに基づいている。これをするために、蛍光色素の励起光及び/又はその発光を細胞の蛍光に影響することなく完全に吸収するさらなる色素が蛍光色素の他に加えられる。この吸収を用い、非特異的背景シグナルをマスキングし、有用な細胞シグナルを以前には不可能であった分解能で検出することができる。

本発明の範囲内である別の解決は、溶液に関して透過性であり、蛍光色素のための励起光及び/又はその発光を細胞の性質に悪影響を及ぼすことなく吸収及び/又は反射する分離層を細胞層に適用することである。同時に分離層の厚さは、蛍光色素があるが細胞がない溶解混合物においては蛍光がもう検出されないように選択される。

本発明のさらに別の変法は、透明支持体にコヒーレント細胞層の形態で適用されるルミネセント(発光性)生物細胞の定量的光学的分析における感度を向上させるためにも本発明の分離層の方法を用いることである。この目的のために、溶液に関して透過性である分離層の光学的性質を、それが細胞の性質に悪影響を及ぼさずに可能な限り強くルミネセント光を反射するように選択する。この方法でルミネセント強度を上げ、かくして測定される効果を有意に増加させることができる。

蛍光もしくはルミネセントリガンドが溶解された形態で存在する溶液で満たされた反応容器内の蛍光もしくはルミネセント標識された反応成分の定量的光学的分析の

ために、本発明の方法を完全に類似のやり方で用いることができ、溶液はこのリガンドに特異的で反応容器の底における透明支持体に適用されるか又はその上に堆積され、レセプターリガンド結合に特徴的なその蛍光もしくはルミネセント放射が透明な底を介して検出され、分析されるレセプター層と接触している。この場合、上記の目的の本発明の解決は、上澄み液、すなわち溶液中にある遊離のリガンド及びその非特異的蛍光もしくはルミネセンスが追加の色素及び／又は拡散的に吸収又は反射する分離層によりマスキングされ、かくして非特異的な背景の蛍光と溶液中のリガンドの特異的蛍光の抵触する重なりの原因が除去されるということに基づいている。非結合リガンドがこの方法でマスキングされるので、測定される蛍光もしくはルミネセンスはリガンドレセプター相互作用の直接の尺度である。この方法においてはそれを経時分解的に (with time resolution) 直接測定することができる。

上記の方法と類似してレセプター研究において、本発明はかくしてマスキング色素を溶液に加える及び／又は溶液に関して透過性の分離層をレセプター層に適用し、マスキング色素及び／又は分離層の光学的性質を、溶液中に存在するリガンドの蛍光色素のための励起光及び／又はその発光もしくはそのルミネセント光が溶液もしくは分離層により吸収されるか又は分離層において反射されるように選択する変法に関する。この場合、分離層の厚さは、蛍光色素があるがレセプター層がない溶解混合物においては蛍光がもう検出されないように選択される。

分離層は好ましくはポリマーラテックスビーズ (例えばポリスチレン、ポリウレタン、ブタジェン、アクリロニトリル) から成る。ラテックスビーズはマスキング色素で染色されていることもでき、この場合それは十分に高いポリマー染色能を有していなければならない。

第1に言及した方法の場合、マスキング色素は、蛍光色素も溶解された形態で含有する溶液中で可能な限り攪拌されねばならない。一般に溶媒は水なので、高い水溶解度 (>2g/ml) を有し、細胞毒性副作用を有していないマスキング色素が有利に用いられる。

本発明のさらに別の展開に従うと、蛍光色素を含有する上澄み液を蛍光色素を含有しない溶液により置換した後、非特異的蛍光を抑制するさらなるマスキング色素を反応容器の壁上加える。

本発明を用い、以下の利点が達成される：

記載されている新規な方法は、それが特別に技術的な解決ではないので、一定の測定システムに束縛されず、多くの商業的に入手可能な装置により用いられることができる。これには透明反応容器、例えばマイクロタイタープレートで底から照射することができ且つ測定することもできる事実上すべての蛍光読み取り機が含まれる。この手段により初めて、非常に少ない費用で (特別な吸収色

素のためのみの最小の追加の経費)、解決している領域、すなわち今日までは達成されなかった電位一感受性蛍光色素の蛍光の変化の測定による細胞膜の電位変化の測定における進歩が可能である。非常に小さい変化の場合でも種々の反応容器からの (例えばマイクロタイタープレートにおける種々のウェル) 結果の直接の比較を行うことが初めて可能であり、反応容器における相対的变化の決定の複雑な手順を省略することができる。結局、例えば速度論的測定のための時間の点における費用は顕著に減少し、分離された標準バッチの参照を用いる簡単な個々の測定 (例えば終点決定) により同じ結果を得る可能性が生まれる。この場合に必要な生物学的バッチの均一性 (例えば均一な細胞層) は、一般に例えばマイクロタイタープレートに関して与えられる。

驚くべきことに、調べられた非常に異なる細胞における種々の水溶性色素及び又それらの混合物の使用は、細胞の生理学への負の影響を示さなかった (例えば全細胞パッチクランプなどの電気生理学的測定又は研究されている薬剤の効果との比較における細胞の反応)。溶解されない色素顔料又は無機微粉砕粒子の使用も驚くべきことに生物学的対象により十分に許容された。

例えば電位一感受性蛍光色素を用いる場合の感度の向上と結び付けられた、生物医学的アッセイにおける定量的蛍光測定において背景蛍光をマスキングするために記載された簡単な方法ならびに例えば反応容器としてのマイクロタイタープレートにこの方法を適合できる結果として、そのような測定法の利用は高い処理量のスクリーニングを有意に簡単にし、それは特に概略されている利点の実現のために技術的経費を増加させる必要がなく、現存の商業的測定装置がこの目的に十分だからである。レセプターリガンド研究の場合、本発明に本質的な利点は、非特異的蛍光もしくはルミネセンスのマスキングの故に、リガンドの非結合画分を除去する必要がもうないことである。結果として試験法は有意に単純化され、感受性コーティング又は例えば細胞などの生物学的対象への損傷又はその破壊が避けられ、測定の感度及びかくして精度が向上する。微粒子の使用の結果として、蛍光もしくはルミネセント標識されたリガンドのコーティングのために利用できる表面積を有意に増加させることができる。例えば比較的高い比密度 (specific density) 又は磁化可能な粒子の使用などの適した手段を用いることにより、透明支持体上における微粒子の沈降及び濃縮を行うことができる。この場合も上澄み液中の非結合リガンドの蛍光もしくはルミネセンスはマスキングにより有効に抑制される。

リガンドとレセプター間の相互作用は非結合画分の除去により妨げられるはずがないので (must not be interrupted)、この方法で1つのそれぞれの反応バッチにおいてリガンドとレセプター間の相互作用の継続的測

定（速度論）を行うこともできる。

下記において作業実施例及び図面を用い、本発明をさらに詳細に説明する。図面において、

図1は先行技術に従う蛍光アッセイのための反応容器を示し、

図2は上澄み液中のマスキング色素を用いる蛍光アッセイにおける背景蛍光の抑制を示し、

図3は分散色素に関する分光励起及び発光ならびにマスキング色素の分光吸収を示し、

図4はマスキング色素なしの部位一依存性細胞蛍光を示し、

図5はマスキング色素を用いた部位一依存性細胞蛍光を示し、

図6は分離層を用いる蛍光アッセイにおける背景蛍光の抑制を示し、

図7は分離層からの背面一反射によるルミネセンスの増幅を示し、

図8は先行技術に従う蛍光アッセイにおける壁蛍光を示し、

図9はマスキング色素を用いる蛍光アッセイにおける壁蛍光の抑制を示し、

図10は上澄み液中のマスキング色素を用いるレセプターリガンド結合の研究のための蛍光もしくはルミネセンスアッセイにおける背景蛍光もしくはルミネセンスの抑制を示す。

図1は、透明な底2を有する蛍光アッセイのための反応容器1を示す。反応容器1内に蛍光色素溶液3があり、その中に蛍光色素分子4が略図的に示されている。溶液3は上澄み液とも呼ばれる。調べられるべき生物細胞は透明な底2の上の透明な支持体上に置かれる。光（励起光）6は細胞5を励起して蛍光を発生しめるために底2を介して照射される。同様に励起される上澄み液3中の蛍光色素分子4に由来する背景蛍光放射8は、細胞5により発生される蛍光7と重なる。しかし生物分析的研究及び細胞5の分析には蛍光7のみが決定的である。しかしすべての既知の蛍光分析装置の場合、背景蛍光8が付加的に測定されるので、細胞5の小さい蛍光の差は強い背景蛍光8中で失われ、それは顕著な感度の損失に導く。

この欠点は図2の本発明に従う方法により、上澄み液3中のマスキング色素によって背景蛍光を抑制することによって避けることができる。図1に存在する背景蛍光8は、図2に従って上澄み液中で完全に吸収される。上澄み液3に加えられるマスキング色素（9により略図的に示される）は溶解された形態か又は微粉碎された分散相として（顔料-着色系（color-pigmented system））存在することができる。しかし好ましくは可溶性色素が用いられ、それはこの場合には添加をピペットを用いて特に簡単に行うことができるからならびに顔料系と対照的に粒度分布及び沈降過程の物理的影響ならびに

層の厚さの不均一性を考慮する必要がないからである。

この型の色素の性質に以下の要求が成される：

一可溶性吸収色素を用いる場合、生物学的アッセイで用いるための優れた水溶性。

05 一細胞の染色を避けるために色素が膜透過性でないこと。

一蛍光色素の励起及び／又は発光波長領域における高い特異的吸収。

一毒性の副作用がないこと（細胞の損傷を避ける）。

10 >2mg/mlの溶解度は優れた水溶液とみなされる。細胞毒性は既知の試験法（例えば細胞毒性試験）を用いて決定されることができる。図3はグラフにおいて蛍光色素及びマスキング色素の光学的（光学的）性質を示している。曲線Aは商業的に入手可能な分散蛍光色素ビス（1, 15 3-ジブチルバルビツール酸）トリメタンオキシノール（Dibac₄（3））のための励起光の分光分布を示し、曲線Bは発生される蛍光の分光分布を示し、曲線Cは用いられるマスキング色素（Brilliant Black BN, C. I. 284 40, Food Black 1, 例えばSigma B-8384）の分光透過（吸収スペクトル）を示す。マスキング色素は蛍光色素の励起及び発光の波長領域においてほとんど完全に吸収されることが認識される。

図4及び5を用いてコントラストの増強又は感度の向上をずっと良く理解することができる。非特異的背景蛍光へのマスキング色素の作用を示すために、電位一感受性蛍光色素Dibac₄（3）（5mM）の存在下で100mg/mlの可溶性マスキング色素Brilliant Blackを加える前及び後に同じ画像部分の2つのビデオ記録を作成した。両方の時に、画像分析により同じビデオラインを評価し、反応容器の同じ部分に及んで2つの蛍光強度プロファイルを示した。この場合の領域Zは細胞層、すなわち生物試料が存在する領域に対応し、この右の■区域では大部分、上澄み液に由来する蛍光シグナルが測定される。記録システムの測定範囲（8ビット）は0（黒）～255（白）である。マスキングされない記録の場合、約1:3.6のコントラスト比（最も暗い画像部分と最も明るい画像部分の強度比）が生じ、マスキングされた記録の場合は約1:14.4のコントラスト比が生ずる。これは4倍のコントラストの向上に相当する。

40 図6に従うと、有用なシグナル対背景シグナルの比率を向上させる別の可能性は、微粉碎された光学的分離層10を用いて細胞層を覆うことである。分離層10は有利には微粉碎された無機白色顔料、例えばTiO₂又はAl₂O₃から成る。これを用い、上澄み液3からの背景蛍光放射が遮蔽されるのみでなく、細胞蛍光の測定可能な量も無機粒子からの反射により増加する。

45 別の場合、分離層は好ましくは200nm～5μmの範囲内の直径を有するポリマーラテックスビーズから成ることができる。適したポリマーは例えばポリスチレン、ポリウレタン、ブタジエン、アクリロニトリルである。ラテッ

ビーズ
分離層も
微粉砕

クスビーズは適したマスキング色素を用いて染色されていることもでき、マスキング色素には溶液に加えられる吸収色素の場合と同じ基準が適用される（上記を参照されたい）。色素の適した種類は例えば「Resoline」である。

ルミネセンスアッセイ（発光細胞）の場合、条件は基本的に生物細胞の特異的な非常に低い光強度を高感度で検出することから成る。図 7 に従って反射性分離層 10 を適用することにより、背景蛍光の抑制のための方法と類似して（図 6 に従う）、生物細胞のルミネセンス信号を増加させることが可能である。これに関しては、放射される方向付けられないルミネセント光の画分 11 が検出器の方向に反射され、かくして特異的測定信号を増加させる。

生物細胞に関する多数の他の蛍光試験法において、分散色素と対照的に、細胞の染色の後に溶液交換により上澄み液から蛍光色素を除去することができる。例えば蛍光色素 FURA2-AM は細胞中に侵入した後に遊離の色素に開裂し、この場合はその細胞膜透過性を失う。結果として非透過性蛍光色素の細胞中における濃縮が起こる。この場合、特異的細胞蛍光を変化させることなく蛍光性上澄み液 3 を蛍光色素-非含有溶液 3a により置換することができる。この方法で上澄み液の非特異的背景蛍光は除去される。しかし FURA2-AM は反応容器を永続的に染色し（壁蛍光）、かくして他の非特異的蛍光信号を生み、それは分散色素の背景蛍光に匹敵する。この状況は図 8 に示されている。この場合、背景蛍光放射 8 は容器の壁に付着している蛍光色素分子 4 に帰せられる。蛍光色素-非含有上澄み液 3a 中にマスキング色素を導入することにより、この非特異的蛍光信号も完全に抑制されることできる。

図 10 には、反応容器 1 の底 2 における透明支持体に適

用される生物層がレセプター 12 を含み、それが上澄み液（溶液）3 中に存在する蛍光もしくはルミネセント標識されたリガンド 13 と特異的結合をする図 2 に類似の作業例がさらに示されている。この場合、結合リガンドは 14

05 により示されている。非標識溶液の場合、底 2 を介して照射される一次光 6 は蛍光標識されたリガンド 13 及び 14 を励起して蛍光を発生せしめる。ルミネセント標識されたリガンドの場合、一次光 6 は適用できない。図 2 に従う実行と類似して、非結合リガンド 13 から発せられる蛍光もしくはルミネセント放射が溶液中で完全に吸収されるように処理するマスキング色素が今度は溶液 3 に加えられる。従って底 2 において測定される蛍光もしくはルミネセント放射 15、すなわち測定される効果はほとんどレセプター 12 に結合したリガンド 14 に帰せられ、溶液 3

15 中の非結合リガンド 13 の背景放射により不純にされない。従って測定信号はリガンド-レセプター結合の強さの直接の尺度である。この場合、レセプター層の層厚さは nm の範囲内にあるがその上にある上澄み液の寸法は数 nm の大きさにある。

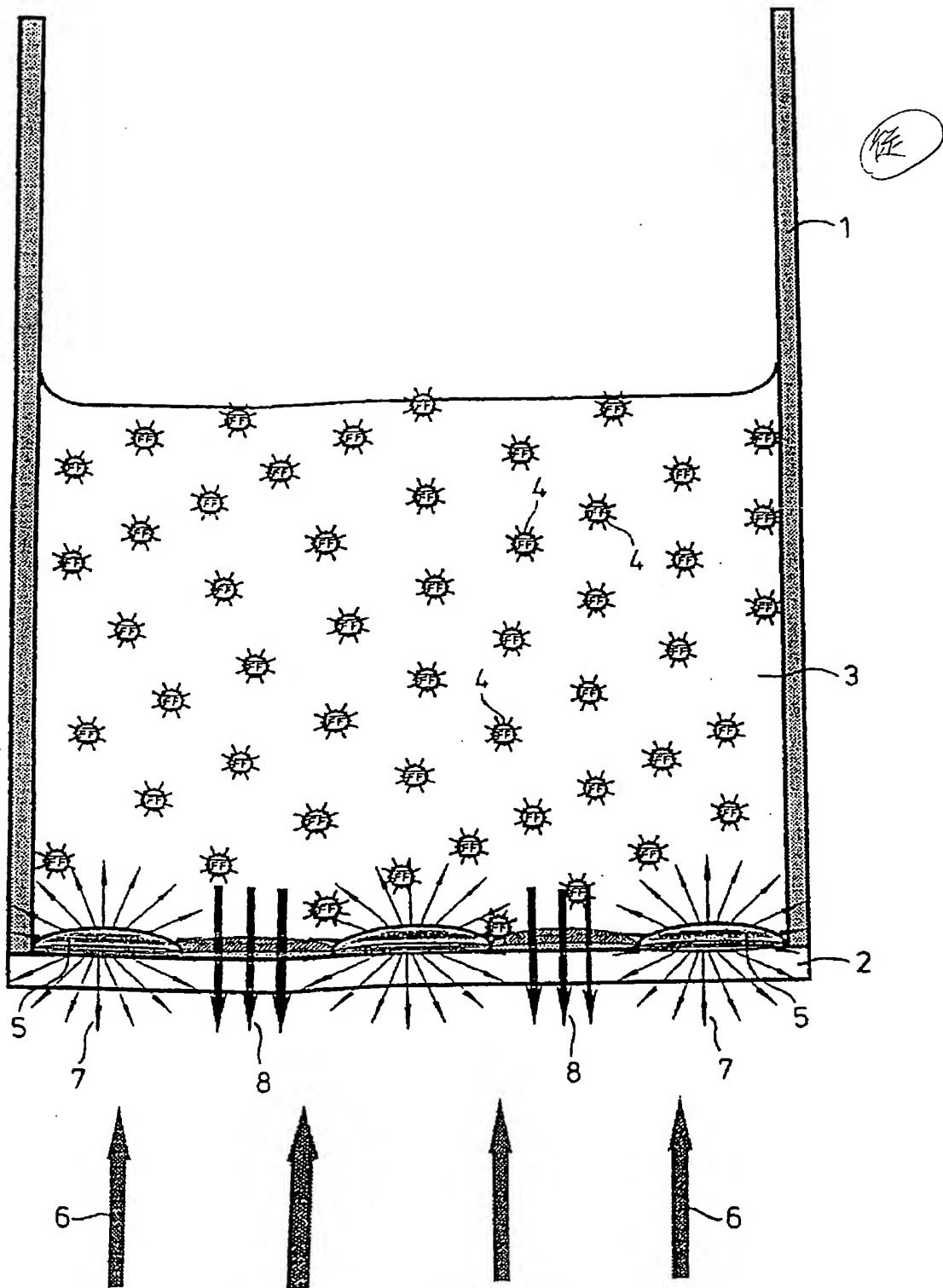
20 図 6 及び 7 に従うと、溶液に関して透過性の分離層 10 を背景蛍光もしくはルミネセンスのマスキング又は抑制と全く類似の方法でリガンド-レセプター結合の研究において用いることができる。この場合、抵触する背景蛍光もしくはルミネセンスが分離層 10 により遮蔽され、ル

25 ミネセントリガンドの場合は結合リガンドに由来する放射されるルミネセント光の画分 11 が反射器に向かう方向に反射され、かくして有用な信号が増加する。

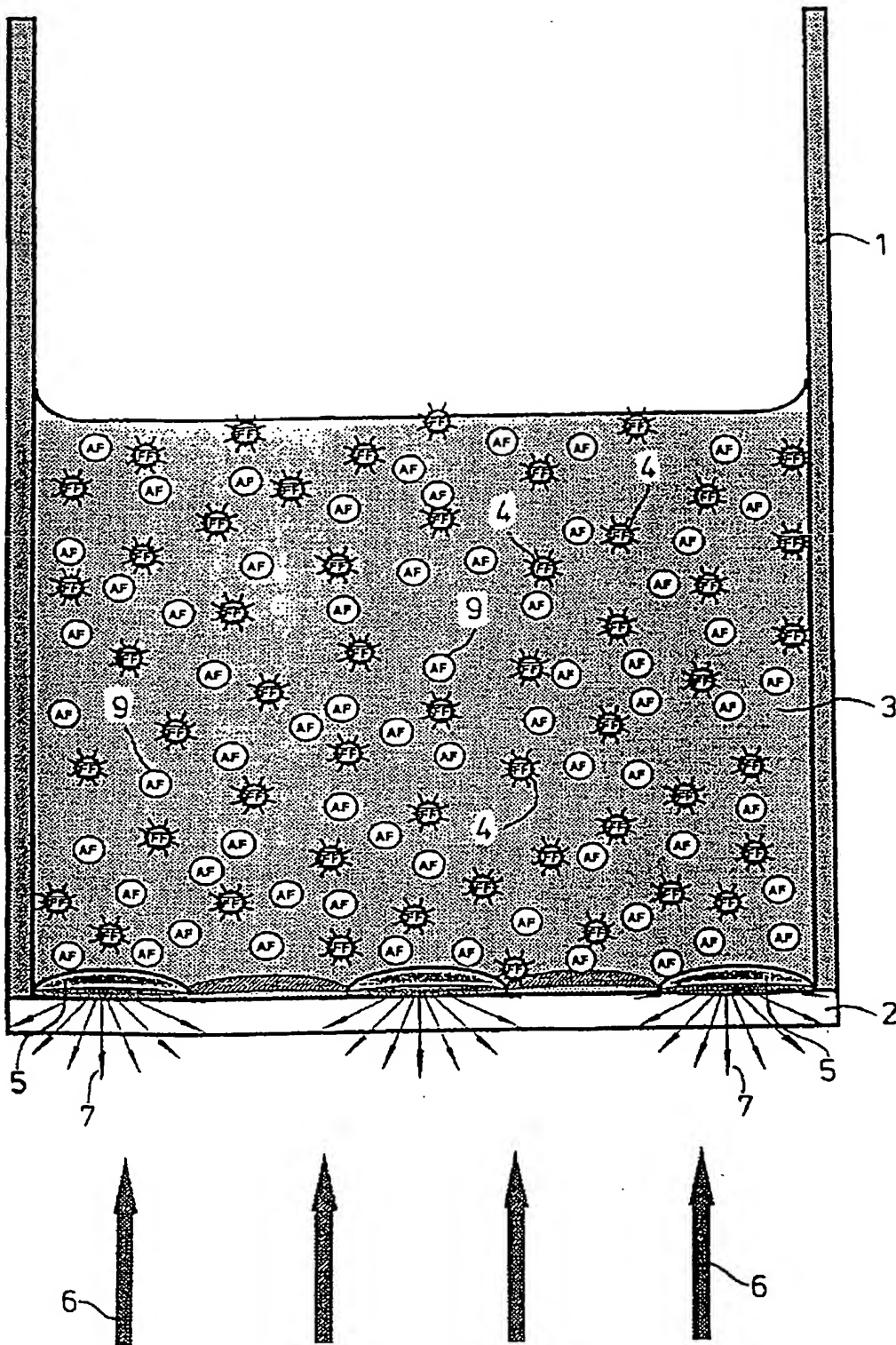
古典的薬理学的レセプター結合研究においてその結合強度に関して評価されるべき非-蛍光もしくはルミネセント反応成分は、明確性のために本明細書では示さなかつた。

30

【第 1 図】

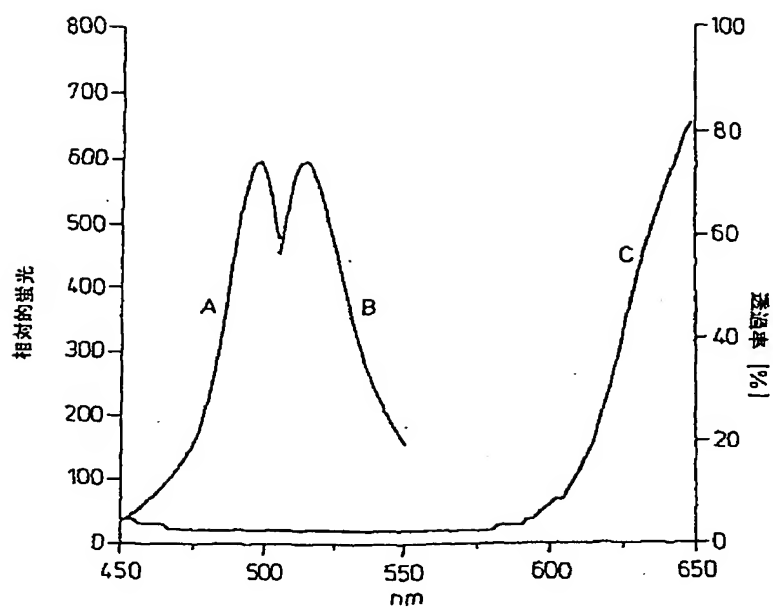


【第2図】

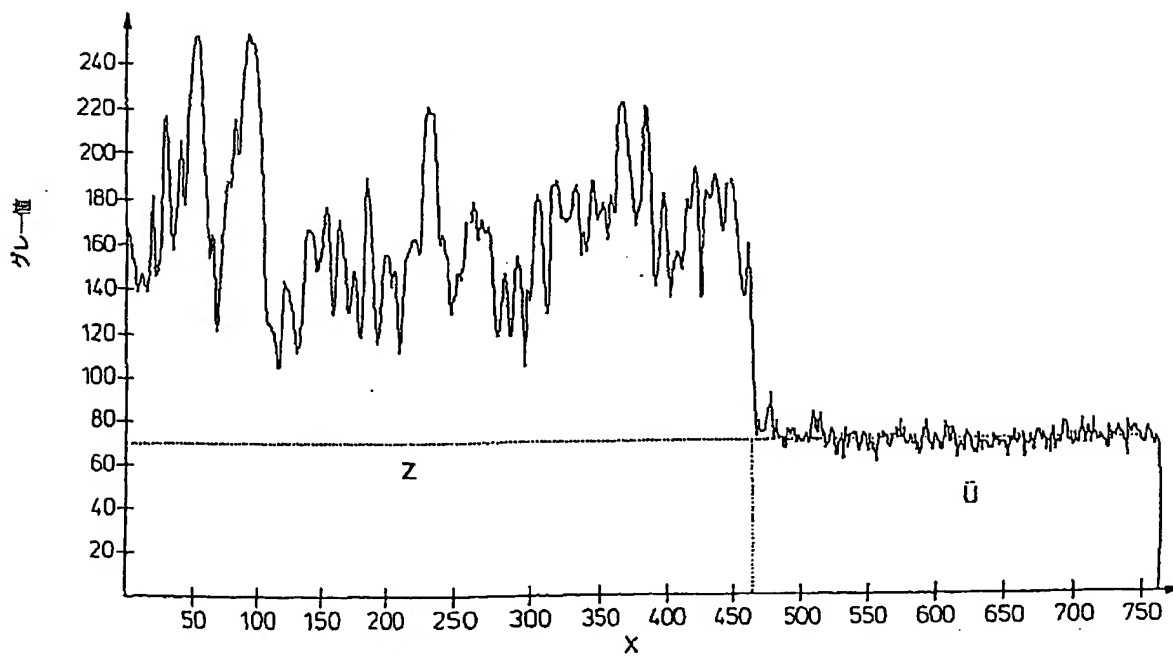


黑色色素

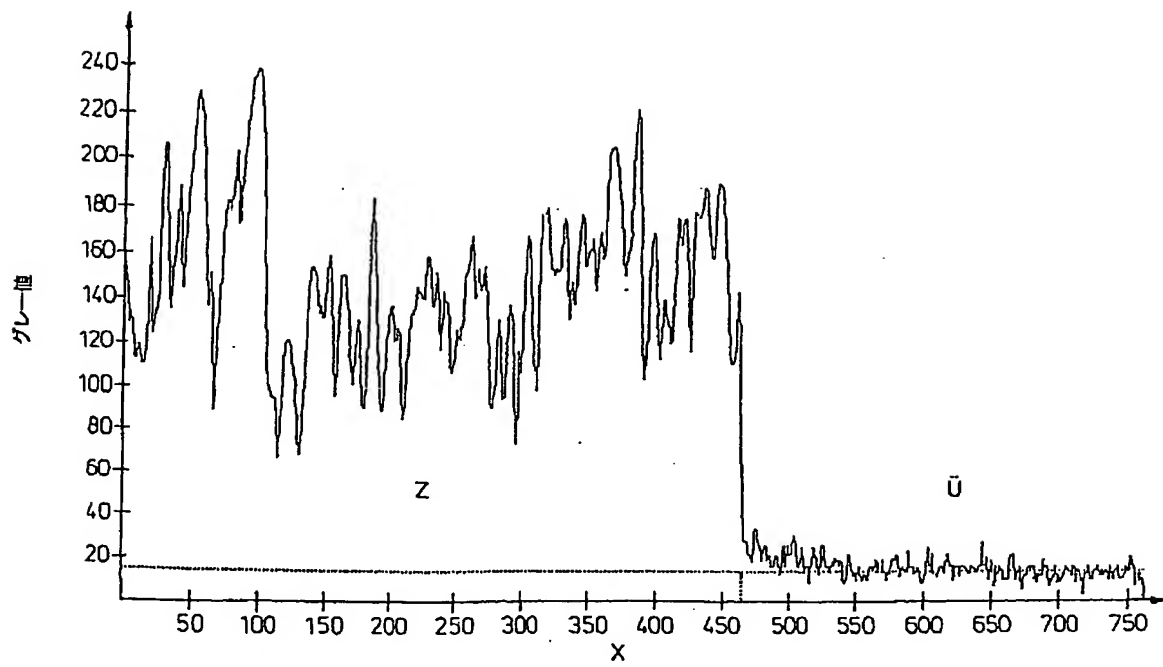
【第3図】



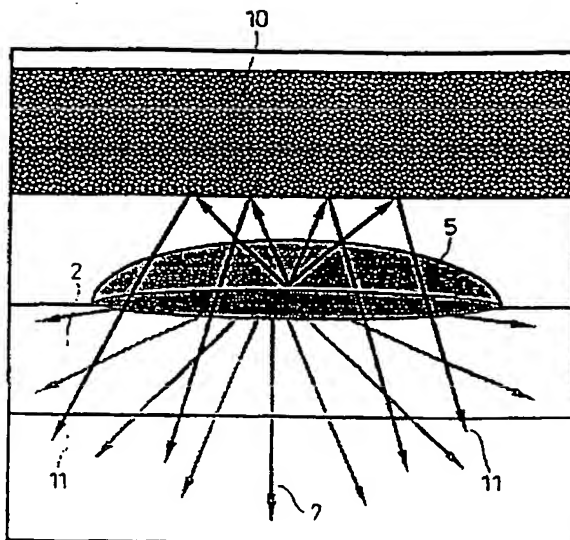
【第4図】



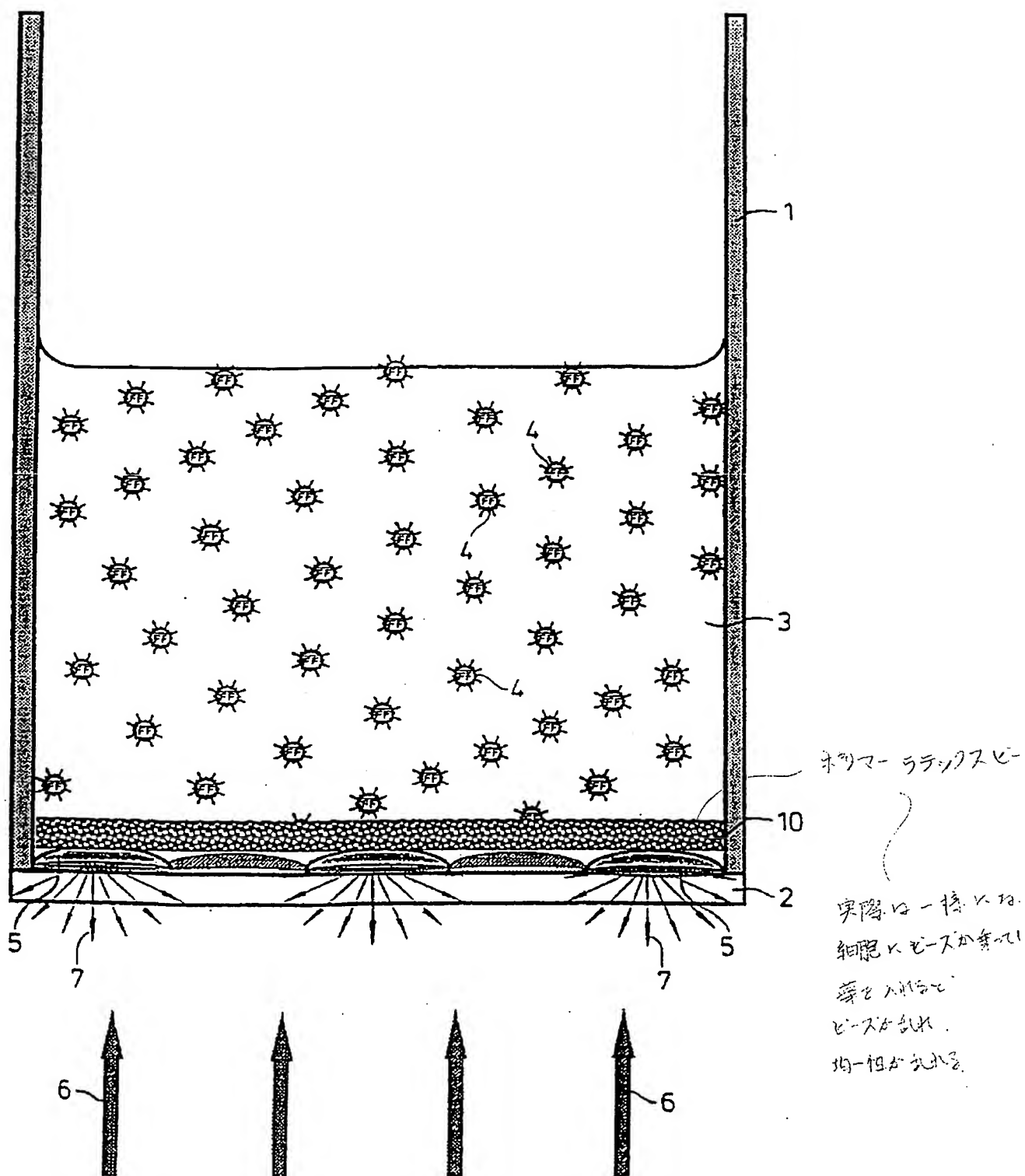
【第5図】



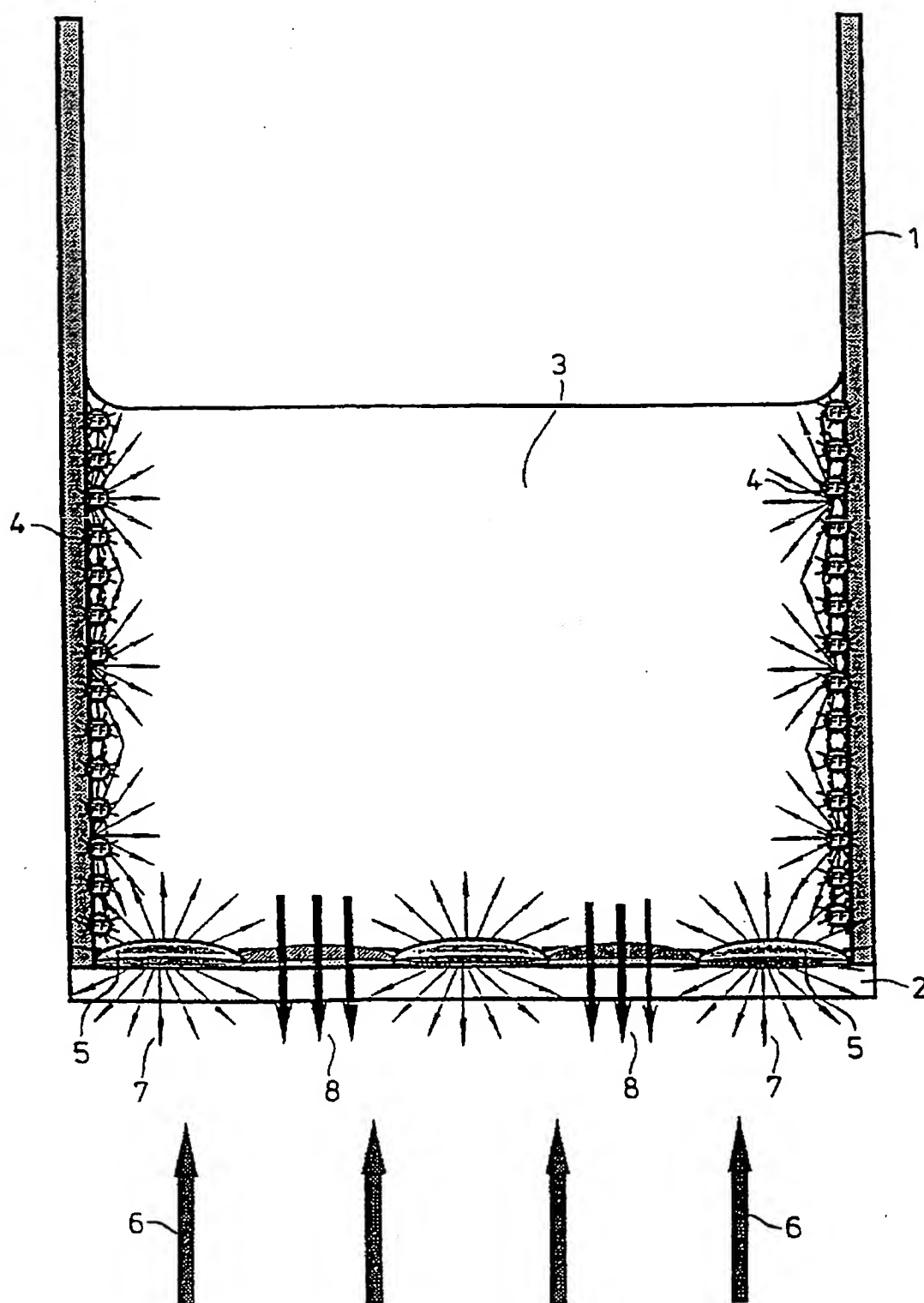
【第7図】



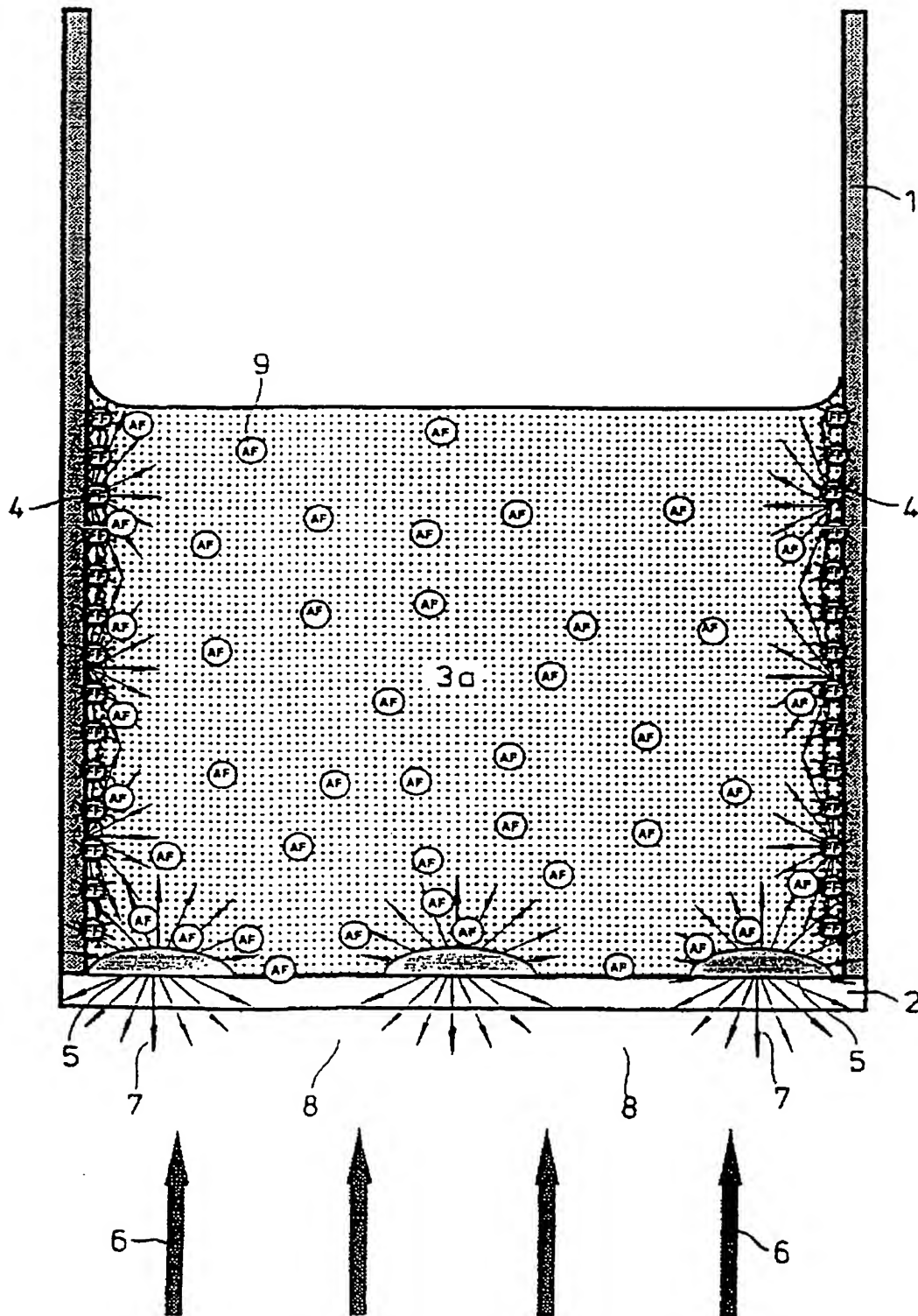
【第6図】



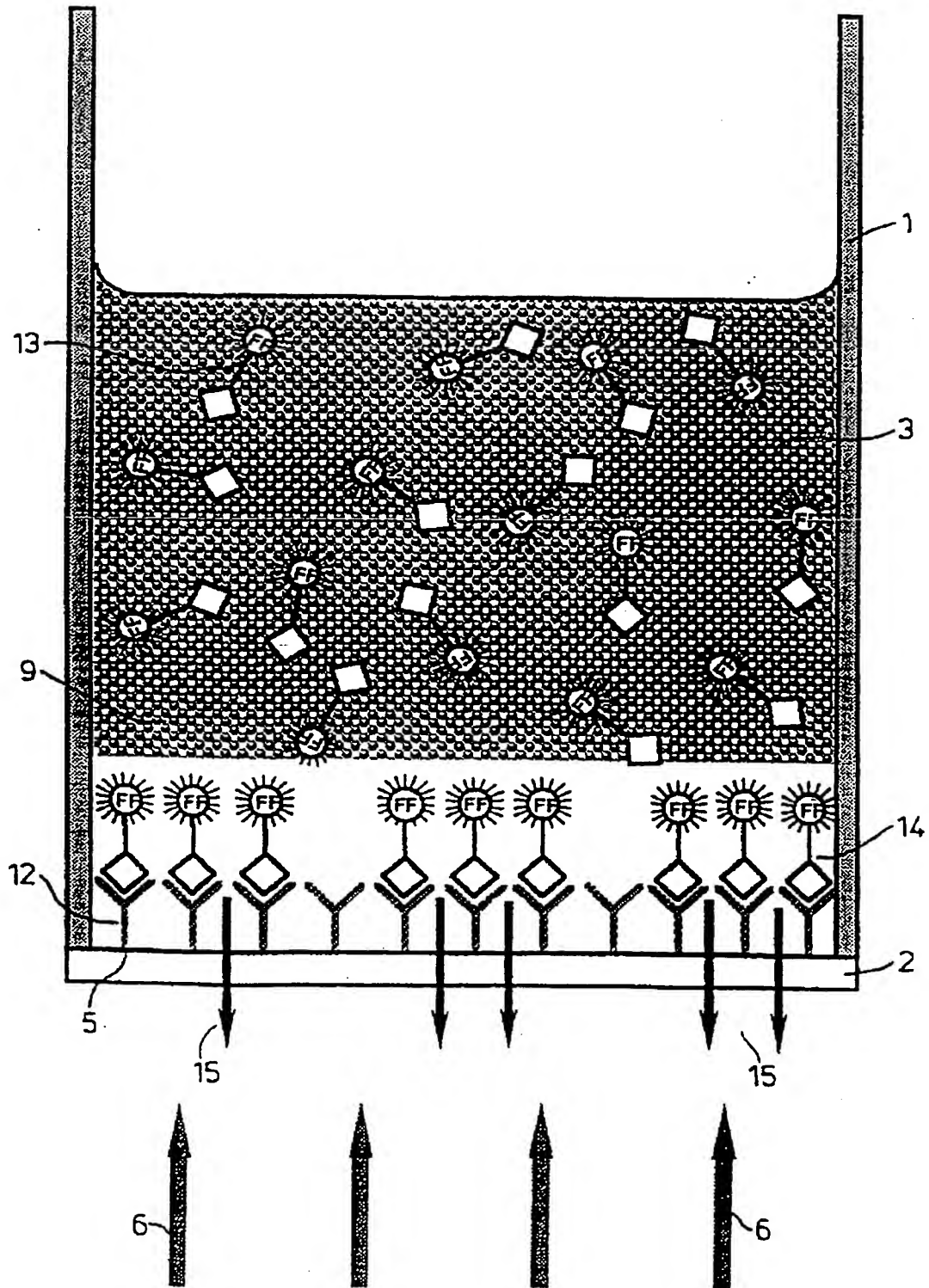
【第 8 図】



【第9図】



【第10図】



(56) 参考文献 特開 平7-120397 (J P, A)
特開 昭62-79334 (J P, A)
國際公開94/002642 (WO, A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N	33/531
G01N	33/536

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.